

機能性食素材トコトリエノールの新規機能性評価 - 生活習慣病予防素材・治療素材としての可能性

著者	河野 翔
学位授与大学	東洋大学
取得学位	博士
学位の分野	食環境科学
報告番号	32663甲494号
学位授与年月日	2021-03-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00012791/

機能性食素材トコトリエノールの新規機能性評価 —生活習慣病予防素材・治療素材としての可能性

学籍番号 4C10180001

氏名 河野 翔

【研究背景】

近年の平均寿命の増加による超高齢化という社会的背景は、種々の疾病の発症リスクの増加、要介護リスクの増加の一因にもなっており、このことから、“健康で生活できる期間”を指す「健康寿命」が注目され、我が国だけでなく世界規模でも健康寿命の延伸は課題となっている。

一方で、年々進歩していく医療技術においても、がんをはじめとする種々の疾病の化学療法における副作用には未だに課題があり、疾病治療のための薬剤が患者の QOL の低下の要因になるリスクとして懸念されている。近年ではこれらの課題の解決策の 1 つとして、化学療法剤の補助剤；Adjuvant として食品栄養素由来の機能性成分に着目した研究が広く行われており[1]、ビタミン E も早くからその機能性が注目され、研究されている機能性食素材の 1 つである。

天然の植物に多く含まれるビタミン E は、トコフェロール (TPs) とトコトリエノール (T3s) の 2 つに大別され、さらにそれぞれにおいて α , β , γ , δ の 4 種の同族体が存在し、主要なビタミン E として 8 種類の同族体 (VEs) が存在する[2]。抗酸化作用はビタミン E の代表的な機能の 1 つとされているが、近年、T3s (特に δ -T3) は抗酸化作用だけではなくそれに依存しない多様な薬理作用を持つことも明らかになってきており、がんをはじめ、骨疾患や心血管系疾患、糖尿病など様々な疾病に対しての効果が期待されている[3]。また、多様な薬理作用を持つ T3s を豊富に含む天然素材は総称して Tocotrienol-Rich Fraction (TRF) と呼ばれ、アナトー種子由来、パーム油由来、米ぬか由来のものが知られている。中でもアナトー種子由来の TRF は δ -T3 : 90%, γ -T3 : 10%,

TPs : 0% といった特徴から天然素材唯一の 100% T3s 素材として注目されている[4, 5]。

本研究では、健康寿命の短縮にも大きく関与する骨粗鬆症およびがんといった病態に着目し、骨質劣化型骨粗鬆症、超難治性がんとされる悪性胸膜中皮腫の 2 つの疾病に対して、アナトー由来 TRF の新たな機能性を探索した。

【第 1 章 骨芽細胞培養系を用いたトコトリエノールの骨質改善作用の解析】

〈目的〉

近年、骨粗鬆症に伴う骨折リスクの増大は低骨密度・低骨量だけでは説明ができず、「骨質」の劣化が指摘されている[6]。骨質を規定するコラーゲン架橋構造は、骨にしなやかさを与える酵素的架橋と、骨の脆弱性を高めてしまう非酵素的架橋の 2 つのタイプの架橋から構成される。骨質の劣化はこの 2 つの架橋のバランスが崩れることによって引き起こされるとされ、酵素的架橋の形成に必須の酵素であるリジルオキシダーゼ (LOX)、また非酵素的架橋の構成因子である終末糖化産物 (AGEs)、この 2 つがそれぞれ重要な因子になっている[7]。

本章では、LOX, AGEs の 2 つの因子に着目し、骨芽細胞培養系を用いて LOX の活性低下メカニズムや AGEs による LOX 発現の抑制機構を明らかにした上で、LOX 発現や AGEs に対するアナトー TRF の作用を検証し、骨質改善作用を有する新規素材としての有用性を探索した。

1. ヒト骨肉腫細胞株における LOX 発現抑制機構の解析

本検証では、LOX の発現レベルが低く、骨芽細胞の機能性評価としても利用されているヒト骨肉腫由来 MG-63 細胞株を使用した。MG-63 における LOX 発現抑制機構を明らかにするために、LOX 発現の抑制に関与しているとされる DNA のメチル化および JAK シグナル経路に着目し[8]、DNA メチル基転移酵素群 (DNMTs) の阻害剤である zebularine (0-200 μ M)、及び JAK の阻害剤である AG490 (0-50 μ M) をそれぞれ使用し、LOX 発現の変化を mRNA レベルで検証した。その結果、いずれにおいても *LOX* mRNA 発現は投与量依存的に増加した。

また、MG-63 における LOX 発現と AGEs の関わりを明らかにするため、AGEs 添加培地 (0-100 μ g/mL) で培養した MG-63 における *LOX* mRNA 発現を解析した結果、100 μ g/mL AGEs 添加後 10 時間の群において *LOX* 発現の抑制が確認された。さらに AGEs 存在下においては AGEs 投与量 (0-100 μ g/mL) 依存的に JAK2 のリン酸化レベルが上昇することが明らかになった。

これらの検証から、MG-63 においては JAK シグナル系の活性化及び DNA のメチル化によって *LOX* 発現が抑制されていること、また AGEs の存在による *LOX* 発現抑制プロセスにおいても JAK2 の活性化の関与があることが示唆された。

2. MG-63 の LOX 発現に対するアナトーTRF の影響

MG-63 における LOX 発現に対するアナトーTRF 由来 TRF の作用を検証するため、その条件検討として、TRF の細胞毒性を示さない最大濃度及び処理時間を決定するために、0, 2.5, 5, 10, 20 μ g/mL の TRF 添加培地で 24 時間及び 48 時間培養し、細胞生存活性に対する TRF の影響を解析した。その結果、両培養時間において TRF 20 μ g/mL 添加群ではコントロール群 (Co ; TRF 0 μ g/mL) と比較して細胞生存活性が有意に減少した。また、48 時間処理群では TRF 10 μ g/mL 添加群においても生存活性の抑制が観察された。

これより、TRF 濃度 10 μ g/mL 以下、かつ 24 時間以内での培養を条件とし、TRF 0, 5, 10 μ g/mL の 3 群で LOX の mRNA 発現およびタンパク発現を解析した。その結果、TRF 10 μ g/mL 添加群では mRNA 発現、タンパク発現のいずれも Co と比較して有意な増加が見られた。また、 α -TP, γ -TP, α -T3, δ -T3 の 4 種の VEs を用いて *LOX* 発現に対する影響を検証した結果、 δ -T3 が最も *LOX* 発現を増加させる結果が得られた。この結果は、 δ -T3 高含有の機能性食素材であるアナトーTRF の *LOX* 発現誘導作用を裏付けるものになった。

3. TRF の LOX 発現増加作用機序の解析

TRF の *LOX* 発現誘導作用の作用機序を明らかにするため、*LOX* 発現の増加が確認された培養条件において JAK シグナル系、DNMTs、また DNMTs の転写因子として知られる FLI1 に対する影響を検証した。JAK シグナル系解析では JAK1 および JAK2 に対する影響を検証した。その結果、JAK2 の総タンパク発現および活性化の指標となるリン酸化タンパク発現は TRF によって抑制された。DNMTs に関しては DNA メチル化活性を持つとされている DNMT1, DNMT3A, DNMT3B の 3 つに対する影響を検証した。その結果、TRF は *DNMT3A*, *DNMT3B* に対して抑制効果を示し、*DNMT1* に対しては影響を及ぼさなかった。さらに転写因子とされる *FLI1* mRNA 発現レベルを解析した結果、JAK, DNMTs 同様に TRF によって抑制された。DNMT3A, 3B は新規の DNA メチル化酵素として知られているため[9]、TRF は *LOX* 遺伝子の新規のメチル化を阻害することによって *LOX* 発現を増加させることが推察された。

一方、AGEs 存在下における TRF の作用を検証するため、10 μ g/mL TRF を前処理して培養した後、100 μ g/mL AGEs を添加して *LOX* mRNA 発現を解析した結果、*LOX* 発現が抑制された TRF 非処理群と比較して前処理群では発現の上

δ -T3 の 6 種類をそれぞれ 0-40 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で添加し、細胞生存活性に対する作用を比較した。その結果、TPs 群では、高濃度 (20, 40 $\mu\text{g/mL}$) の δ -TP 添加群において約 2 割の生存活性の抑制作用が見られた。一方、T3s 群においては γ -T3, δ -T3 添加群において生存活性抑制作用が見られ、特に δ -T3 添加群では 10 $\mu\text{g/mL}$ の低濃度群においても 9 割以上の抑制作用を示した。また、本章でも第 1 章同様にアナトー由来 TRF を用いて同条件で検証した。その結果、20, 40 $\mu\text{g/mL}$ 添加群において、生存活性が強く抑制された。この結果から、TRF (δ -T3) が有力な抗 MPM 素材である可能性が示唆された。

一方で、Nor, Hyp の条件別に生存活性抑制作用を比較すると、 γ -T3, TRF 添加群では、同濃度条件において Hyp 群の方が感受性を高く示す傾向が見られた。

この結果を受け、低酸素環境下の H2452 に対して TRF はどのようなプロセスで細胞死を誘導しているのかを検証するため、H2452 における低酸素誘導性因子;HIFs の発現制御に着目し、TRF による影響を検証した。その結果、低酸素環境下で培養した Hyp 群 (TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 群) の H2452 では、Nor 群と比較して高レベルの HIF-1 α , HIF-2 α タンパクが確認でき、反対に Hyp の TRF 15 $\mu\text{g/mL}$ 添加群では、Hyp の TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 群と比較して HIF-1 α , HIF-2 α いずれもタンパクレベルは抑制されていた。また、生存活性抑制作用を示さなかった TRF 5 $\mu\text{g/mL}$ 添加群においては、HIFs のタンパクレベルは Hyp の TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 群と差が見られなかったことから、低酸素環境で生育する H2452 に対する TRF の生存活性抑制作用は、低酸素適応機構の破綻 (HIFs タンパクレベルの制御) によって引き起こされた可能性が示された。

2. 低酸素誘導性 ER ストレスに着目した TRF の抗 MPM 作用の作用機序解析

TRF の HIFs 抑制作用と H2452 に対する生存

活性抑制作用の関連性をさらに明らかにするため、低酸素誘導性小胞体 (ER) ストレスに着目した。

酸素の不足によってエネルギー欠乏が起こるとタンパク質の合成や翻訳語の折りたたみ機能は制限され、正常に折りたたまれなかったタンパク質などが小胞体に蓄積する。この状況を ER ストレスと呼び、腫瘍組織深部の低酸素領域に存在する腫瘍細胞内では ER ストレスが亢進していることも報告されている[13]。一方で、細胞自身は HIFs による低酸素応答に加えて ER ストレスに対する応答機構 (UPR) も併せ持ち、タンパク質の翻訳量の制限や折りたたみ機能の向上によって ER の恒常性の回復に努めるが、持続したストレス下ではアポトーシスを誘導することも明らかになっている[14]。これまでの検証において、低酸素環境で培養した H2452 では高レベルの HIFs が確認できていることから、ER ストレスが亢進していることは容易に考えられ、このことから TRF による HIFs 阻害は低酸素適応機構の破綻を招き、ER ストレスの更なる亢進によって細胞死が誘導されている可能性が考えられた。

そこで、ER ストレスセンサーである Bip, ER ストレス誘導性アポトーシスマーカーである CHOP を指標にして低酸素環境下の H2452 におけるストレス適応とそれに対する TRF の作用を検証した。その結果、HIFs タンパクレベルの上昇が確認された Hyp 培養群 (TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 群) においては Bip, CHOP 発現のいずれも Nor 培養群より増加傾向を示した。その一方で、HIFs タンパクレベルの抑制および H2452 の細胞死が確認された Hyp での TRF 15 $\mu\text{g/mL}$ 群では、Hyp の TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 群と比較して発現上昇の程度は低い結果となった。Nor 培養群での解析では、TRF 15 $\mu\text{g/mL}$ 添加群において CHOP の発現が強く誘導されたことから、Hyp での TRF 15 $\mu\text{g/mL}$ 群においてもより強い CHOP 発現の誘導が観察されると思われたが、それとは反対の傾向となった。

先行研究において、低酸素環境の腫瘍細胞における CHOP の発現誘導は、“低酸素”そのものではなく HIF-1 α 依存的であるとする報告がある[15]。これは、低酸素環境（ストレス環境）における生存（救済）シグナルとして HIF-1 α が CHOP 発現を誘導していることを示唆したものである。本検証で確認された我々の結果もこの報告に近いものであると考えられる。即ち、Hyp の TRF 0 $\mu\text{g/mL}$ 、TRF 5 $\mu\text{g/mL}$ 群で見られた CHOP 発現の誘導は HIFs 依存的なものであり、一方、Hyp の TRF 15 $\mu\text{g/mL}$ 群では、HIFs 依存的な CHOP 発現ではなく Nor 群で観察されたような TRF 自身の ER ストレス誘導作用による影響である可能性が考えられた。

〈結論〉

TRF は MPM 細胞に対する ER ストレッサーとして抗 MPM 作用を発揮することが示唆された。また、低酸素環境下の MPM 細胞に対しては HIFs の阻害によって生存の救済に働く HIFs 依存的なストレス応答機構を減衰させ、TRF 自身が持つ ER ストレス誘導作用によってアポトーシスを引き起こしている可能性が示唆された（Fig. 2）。

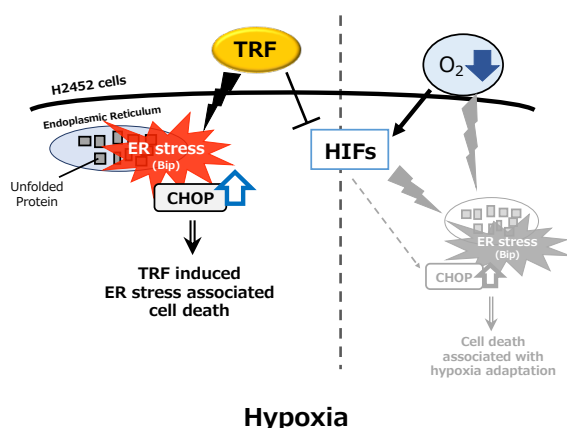


Fig. 2. A schematic representation of the suggested mechanisms for the anti-MPM effect of TRF under hypoxia

〈方法〉

H2452 株は RPMI 1640 (D-(+)-Glucose, L-Glutamine, Phenol Red) + 10% FBS, + 0.5%

Penicillin-Streptomycin, + 1% HEPES, + 1% Glucose, + 1% Sodium pyruvate を用いて、37°C, 5% CO₂ 下において培養した。低酸素環境はアネロパック®ケンキ (O₂ < 0.1%) を用いて再現した。細胞生存活性評価は WST-8 法, タンパク発現解析は Western blot 法を用いてそれぞれ解析した。統計解析はエクセル統計ソフトを使用し、Dunnett's test 及び Tukey-Kramer's test を用いて解析した。

※本研究は平成 31 年度井上門了記念研究助成金, 2020 年度井上門了記念研究助成金により遂行した。また本研究の一部は JSPS 科研費 18K11058 (基盤研究 C) の助成を受けて遂行した。

【総括】

本研究では、骨質劣化型骨粗鬆症、悪性胸膜中皮腫といった 2 つの疾病モデル (*in vitro*) を用いて、第 1 章では骨芽細胞培養系における LOX 発現誘導作用、第 2 章では中皮腫細胞株に対する生存活性抑制作用といった TRF の異なる作用を見出した。さらに本研究では、骨質劣化メカニズムの解析および悪性胸膜中皮腫の生存シグナル解析を通して、生体内の炎症や免疫応答と密接に関連している JAK シグナル経路、肥満や糖尿病といった遺伝性・生活習慣病との関連も報告されているエピジェネティック現象の 1 つである DNA のメチル化、さらにはがんの治療分野において治療標的として注目されている転写因子 HIFs, これらに対する TRF の作用点を明らかにした。

以上の本研究における成果は、骨質劣化型骨粗鬆症や悪性胸膜中皮腫に限らず、様々な疾病に対しても TRF が有効に機能する可能性を示し、また、多くの疾病の分子標的治療の研究の発展に貢献できるものであると考える。

【参考文献】

- Constantinou, C., A. Papas, and A.I. Constantinou, *Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs*. Int J Cancer, 2008. **123**(4): p. 739-52.
- Müller, L., K. Theile, and V. Böhm, *In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma*. Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(5): p. 731-42.
- Aggarwal, B.B., et al., *Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(11): p. 1613-31.
- Peh, H.Y., et al., *Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol*. Pharmacol Ther, 2016. **162**: p. 152-69.
- Frega, N., M. Mozzon, and F. Bocci, *Identification and estimation of tocotrienols in the annatto lipid fraction by gas chromatography mass spectrometry*. J Am Oil Chem Soc, 1998. **75**: p. 1723-1727.
- Panel, N.C.D., *Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy*. Jama, 2001. **285**(6): p. 785-95.
- Saito, M., *Bone quality markers : pentosidine, homocystein and MTHFR polymorphism*. Kidney Metab Bone Dis, 2008. **21**(4): p. 325-334.
- Thaler, R., et al., *Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 5578-88.
- Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
- Milano, M.T. and H. Zhang, *Malignant pleural mesothelioma: a population-based study of survival*. J Thorac Oncol, 2018. **5**(11): p. 1841-1848.
- Kitazono-Saitoh, M., et al., *Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines*. Oncol Rep, 2012. **28**(1): p. 33-40.
- 近藤科江, 低酸素誘導性因子 *HIF* の機能と低酸素-幹細胞用形質-治療抵抗性のリンク. 実験医学 (増刊) がん幹細胞-ステムネス, ニッチ, 標的治療への理解, ed. 羊土社. Vol. 29. 2011.
- Bartoszewska, S. and J.F. Collawn, *Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia*. Cell Mol Biol Lett, 2020. **25**: p. 18.
- Asada, R. and K. Imaizumi, *The roles of endoplasmic reticulum stress in diseases*. Biomedical Gerontology, 2013. **37**(9): p. 9-16.
- Delbrel, E., et al., *HIF-1alpha triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveolar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17939.